

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Сборник научных трудов

Основан в 2003 году

Под редакцией члена-корреспондента
НАН Беларуси В. К. Пестиса

Том 21

ЗООТЕХНИЯ

*Гродно
ГГАУ
2013*

УДК636.2.082.2

МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Н.А. Глинская

УО «Полесский государственный университет»,
г. Пинск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 23.07.2013 г.)

Аннотация. На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведено генетическое тестирование по 11-STR локусам нуклеотидных последовательностей ДНК и изучена межпопуляционная дифференциация по микросателлитам ДНК крупного рогатого скота.

Summary. On the basis of the educational establishment "Polesye State University" in a research laboratory of an industrial biotechnology genetic testing on 11-STR loci of the nucleotide sequences of DNA is conducted and interpopular differentiation according to cattle DNA microsatellites is studied.

Введение. Мировая тенденция индустриализации сельского хозяйства несет в себе множество рисков. Один из них – это сокращение национальных генетических ресурсов животных. Включение в отечественное сельское хозяйство транснациональных животноводческих индустрий создает опасность сокращения собственных генетических ресурсов сельскохозяйственных видов, зависимость от импорта, а также угрозу глобализации распространения инфекций и скрытых генетических дефектов. Отсюда следует всевозрастающая важность сохранения генофондов отечественных сельскохозяйственных видов животных.

Сегодня проблемы контроля и управления породами сельскохозяйственных животных приобретают международное значение, поскольку затрагивают многие страны мира, особенно обладающие большой территорией, различными агроэкологическими и экономическими условиями. Проблему сохранения генетических ресурсов местных пород животных мировое сообщество тесно связывает с необходимостью сохранения культурных традиций, биологизации сельского хозяйства, с продовольственной безопасностью, устойчивым развитием сельского хозяйства в мире и его отдельных регионах, а также качеством жизни в целом.

Потеря породного разнообразия оказывается не только утратой уникального и бесценного генетического разнообразия, но и сужением генетического потенциала, принципиально ограничивающим возможности селекционной работы, породообразовательного процесса в настоящем и будущем [3, 5].

Важность сохранения «культурного» биоразнообразия подтверждена в международной конвенции о биологическом разнообразии, принятой на форуме «повестка дня на XXI век». В конвенции подчеркивается значение сохранения и регионального использования генетических ресурсов для продовольствия и сельского хозяйства с учетом взаимозависимости стран, обладающих этими ресурсами, для продовольственной безопасности планеты.

Сегодня в Беларуси нет надежной системы (организационной и биологической) сохранения генетических ресурсов. Современные подходы к сохранению биоразнообразия не дают четкого ответа на вопросы: «какие породы необходимо сохранять и каковы должны быть принципы сохранения». При наличии представлений о фенотипическом «стандарте» породы отсутствуют данные и принципы выявления генетического, генофондного «стандарта» породы, нет четкого представления о таких понятиях, как «единица, эффективность и потенциал сохранения, генетические: уникальность, мониторинг и паспортизация», об оценке генетического разнообразия на молекулярно-генетическом уровне и т.д. От-

сутствие фундаментальных знаний, концепций, стратегий, тактик и законов о сохранении генетических ресурсов животных в целях обеспечения продовольственной безопасности препятствует формированию надежных и современных механизмов сохранения и управления породным разнообразием и породообразовательным процессом [4, 6].

Очевидно, что первым этапом в разработке программ по сохранению пород является определение методов и принципов выявления их генетического своеобразия. Исследования генетической структуры локальных пород различных видов сельскохозяйственных животных с помощью популяционно-генетических методов необходимы, прежде всего, для создания генетически обоснованных программ по выявлению генетической изменчивости, ее анализу в целях дальнейшего сохранения и использования, в том числе для нужд современного агропромышленного комплекса. В связи с чем целью наших исследований служило изучение межпопуляционной дифференциации по микросателлитам ДНК крупного рогатого скота черно-пестрой породы.

Материал и методика исследований. На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведено генетическое тестирование по 11-STR локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53.

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы, разводимый в хозяйствах: КСУП «ПЗ «Красная звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», ОАО «1-я Минская птицефабрика», СПК «Першаи-2003», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Шикотовичи», ПЗ «Муховец», ОАО «Птицефабрика «Дружба», РУСП «Минское племпредприятие».

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре «NanoDrop 1000».

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 15 мкл и включала следующие компоненты: ПЦР буфер – 1,5 мкл; $MgCl_2$ (25 mM) – 1,8 мкл; dNTP mix (10-12 mM) – 1,5 мкл; праймеры (mix) – 3 мкл; Taq-полимераза – 1 ед; ДНК 1 мкл (конц. 100 – 200 нг/мкл); вода (дистиллированная) – до 15 мкл.

Для проведения амплификации использовались меченные праймеры. В качестве меток использовались FAM, JOE и NED метки, флюорисцирующие синим, зеленым и желтым цветами соответственно.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе *TPProfessional basic*. Режим амплификации состоял из следующих ша-

гов: «горячий старт» – 3 мин при 95⁰С; 97⁰С – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95⁰С, отжиг – 65⁰С – 1 сек и 59⁰С – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68⁰С; достройка 30 сек – 70⁰С и охлаждение 4⁰С.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5% агарозном геле (при напряжении 130 В в течение 20 минут).

Визуализацию и анализ результатов осуществляли на трансиллюминаторе Quantum.

Перед постановкой в секвенатор образцы помещали в амплификатор на денатурацию в смеси объемом 15 мкл, включающую: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ–500 size standart и 13,3 мкл формамида.

Денатурацию проводили в течение 5 мин при 95⁰С с последующим охлаждением при 4⁰С. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор «ABI Prism 3130», руководствуясь протоколом.

Определение длин выявленных генотипов ДНК в исследуемых локусах проводили при помощи программы GenneMapper Software Version 4.0. Были рассчитаны популяционно-генетические характеристики по (Nei *et al.* 1983).

Результаты исследований и их обсуждение. При тестировании обследованного поголовья (n=518) было установлено (таблица 1), что популяции крупного рогатого скота черно-пестрой породы КСУП «ПЗ «Красная звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», ОАО «1-я Минская птицефабрика», СПК «Першаи-2003», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Шикотовичи», ПЗ «Муховец», ОАО «Птицефабрика «Дружба» и РУСП «Минское племпредприятие» заметно различаются по наличию (Na), частоте встречаемости аллелей микросателлитных локусов и уровню полиморфности (формула 1, 2, 3). Были выявлены специфические для определенной популяции аллели – «приватные» аллели (Pa).

Таблица 1 – Характеристика популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы по 11 локусам микросателлитов ДНК

Популяция	n	Na	Pa	Ae	Ho	He	Fis
КСУП «ПЗ «Красная звезда»	193	167	12	10,799	0,923	0,894	-0,020
СПК «Агрокомбинат Снов»	111	114	-	10,767	0,886	0,789	-0,149
ОАО «1-я Минская птицефабрика»	50	111	-	9,069	0,864	0,841	-0,031
СПК «Першаи-2003»	42	75	1	4,550	0,870	0,742	-0,170
РСУП «Брестплемпредприятие»	40	96	-	6,269	0,859	0,778	-0,135
РСУП «Шикотовичи»	39	121	-	9,534	0,867	0,857	-0,019
ПЗ «Муховец»	25	108	-	6,778	0,909	0,834	-0,092
ОАО «Птицефабрика «Дружба»	10	62	-	4,134	0,882	0,709	-0,279
РУСП «Минское племпредприятие»	8	68	1	4,117	0,882	0,716	-0,289

Самый широкий спектр аллелей (167 аллелей по 11 локусам), максимальное число «приватных» аллелей (12) и наибольший уровень полиморфности (10,799) были выявлены у исследованных животных КСУП «ПЗ «Красная звезда», в то время как самый узкий спектр аллелей (62), отсутствие «приватных» аллелей и наименьший уровень полиморфности (4,134) были выявлены у животных, разводимых в ОАО «Птицефабрика «Дружба».

Необходимо отметить, что выборка животных ОАО «Птицефабрика «Дружба» значительно меньше и, возможно, этот фактор препятствовал эффективному раскрытию резервов изменчивости данной популяций и в дальнейших исследованиях, посвященных ей, будут найдены дополнительные аллели локусов микросателлитов ДНК.

По одному «приватному» аллелю обнаружено в популяциях животных СПК «Першаи-2003» и РУСП «Минское племпредприятие».

Анализ генетического разнообразия исследованных популяций показал, что наблюдаемая степень гетерозиготности варьировала от 0,859 (РСУП «Брестплемпредприятие») до 0,923 (КСУП «ПЗ «Красная звезда»). Показатели ожидаемой степени гетерозиготности варьировали от 0,709 (ОАО «Птицефабрика «Дружба») до 0,894 (КСУП «ПЗ «Красная звезда»). Показатель индекса фиксации (Fis) имел отрицательное значение во всех исследованных популяциях животных, что говорит о смещении генетического равновесия в данных группах в сторону избытка гетерозигот.

В целом соотношение ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, а также показателя Fis изученных популяций животных говорит об избытке гетерозигот в них и высоком «запасе» генетического разнообразия по STR-локусам.

Также был проведен кластерный анализ генетических расстояний между изученными популяциями животных крупного рогатого скота черно-пестрой породы (таблица 2).

Таблица 2 – Генетические дистанции между популяциями КРС черно-пестрой породы

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0,116	-							
3	0,101	0,085	-						
4	0,122	0,107	0,093	-					
5	0,085	0,069	0,054	0,076	-				
6	0,098	0,082	0,068	0,089	0,051	-			
7	0,095	0,079	0,065	0,086	0,048	0,062	-		
8	0,100	0,084	0,070	0,091	0,053	0,066	0,064	-	
9	0,086	0,070	0,056	0,077	0,039	0,053	0,049	0,055	-

Проведенный анализ показал, что наименьшее генетическое расстояние между популяциями КРС РСУП «Брестплемпредприятие» и РУСП «Минское племпредприятие» (0,039), а наибольшее – между популяциями КРС КСУП «ПЗ «Красная звезда» и СПК «Першаи-2003» (0,122).

Заключение. Таким образом, сравнительная оценка полиморфизма 11 STR-локусов у КРС черно-пестрой породы 9 изученных популяций показала, что каждая популяция имеет свою генетическую структуру с наличием или отсутствием «приватных» аллелей. Причем установлен высокий уровень генетического сходства данных популяций. Выявленные генетические особенности КРС черно-пестрой породы разных популяций Беларуси дают дополнительную информацию для изучения их происхождения и могут быть использованы в программах по сохранению генофонда малочисленных популяций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Животовский, Л. А. Популяционная биометрия / Л. А. Животовский. – М.: Наука, 1991. – 271 с.
2. Меркурьева, Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве – Москва «Колос» – 1977. 174.
3. Столповский, Ю.А. Сокращение породного разнообразия КРС // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С. 168–175.
4. Столповский, Ю.А. Сохранение генетических ресурсов крупного рогатого скота // Генетические ресурсы крупного рогатого скота / Под. ред. И.А. Захарова. М.: Наука, 1993. С. 5–19.
5. Столповский, Ю.А., Захаров И.А. Генетические аспекты проблемы сохранения биологического разнообразия домашних животных // Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / ред. И.А. Захаров. М.: Наука, 2006. С. 8–22.
6. Сулимова, Г.Е., Столповский Ю.А., Каштанов С.Н., Моисеева И.Г., Захаров И.А. Методы управления генетическими ресурсами domesticированных животных / Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. С. 331–340.
7. Guo, S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Thomson // Biometrics. – 1992. – Vol. 48 – P. 361–372.
8. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // Evolution. – 1965. – Vol. 19. – P. 355–420.